

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 1월 26일 (26.01.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/014494 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 8/64 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/007698
- (22) 국제출원일: 2016년 7월 14일 (14.07.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0101686 2015년 7월 17일 (17.07.2015) KR
10-2015-0144693 2015년 7월 17일 (17.07.2015) KR
- (71) 출원인: (주)오베론코스메틱 (OBERON COSMETIC CO., LTD) [KR/KR]; 07936 서울시 양천구 중앙로 53길 65, 203호, Seoul (KR). 주식회사 코씨드바이오팜 (COSEEDBIOPHARM CO., LTD) [KR/KR]; 28161 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명 2로 68, Chungcheongbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 이상정 (LEE, Sang Jung); 22202 인천시 남구 소성로 120, 102동 801호, Incheon (KR).
- (74) 대리인: 특허법인태동 (TAEDONG INTERNATIONAL PATENT&LAW FIRM); 08302 서울시 구로구 가마산로 282, 302호, Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: COSMETIC COMPOSITION FOR LIFTING SKIN AND PREVENTING AGING, CONTAINING COBWEB EXTRACT

(54) 발명의 명칭 : 거미줄 추출물을 함유하는 피부 리프팅 및 노화 방지용 화장품 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to a cosmetic composition containing, as an active ingredient, a cobweb peptide having a molecular weight of 10 to 70 kDa or a cobweb hydrolysate obtained by hydrolysing a cobweb through the fermentation of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*. The cobweb peptide having a molecular weight of 10 to 70 kDa or the cobweb hydrolysate obtained by hydrolysing cobweb through the fermentation of *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus* exhibits an excellent antioxidative effect, MMP-1 production inhibitory effect, collagen synthesis promoting effect, and elastase inhibitory effect, and the cosmetic composition, of the present invention, containing, as an active ingredient, the cobweb peptide or the cobweb hydrolysate, exhibits excellent effects of skin moisturization, skin elasticity promotion, and skin wrinkle alleviation.

(57) 요약서: 본 발명은 10~70 KDa의 분자량을 가지는 거미줄 펩타이드 또는 거미줄을 붉은떡다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물에 관한 것으로, 10~70 KDa의 분자량을 가지는 거미줄 펩타이드 또는 거미줄을 붉은떡다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물은 우수한 항산화 효과, MMP-1 생성 억제효과, 콜라겐합성 증진효과, 엘라스타아제 억제효과를 발휘하며, 본 발명의 거미줄 펩타이드 또는 거미줄 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물은 우수한 피부 보습 효과, 피부 탄력 증진효과 및 피부 주름 개선효과를 발휘한다.



WO 2017/014494 A1

명세서

발명의 명칭: 거미줄 추출물을 함유하는 피부 리프팅 및 노화 방지용 화장품 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 거미줄 추출물을 함유하는 피부 리프팅 및 노화 방지용 화장품 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 10~70 KDa의 분자량을 가지는 거미줄 웹타이드 또는 거미줄을 붉은덕다리버섯(*Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*) 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물을 유효성분으로 함유하여 우수한 항산화 효과, 피부 주름개선 효과, 피부 보습 효과, 엘라스타아제 억제 효과 및 피부 탄력증가 효과를 발휘하는 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 피부의 각질층(Stratum Corneum, SC)은 피부 최외각층에 존재하면서, 외부의 유해미생물, 자외선, 오염물질, 열 등의 물질로부터 우리 몸을 보호하고, 피부 수분 증발 및 피부 수분 보유량 등을 조절하는 역할을 수행하는 곳으로 흔히들 피부장벽기능이라고 알려져 있으며, 우리 몸에서 가장 표면적이 큰 것으로 알려져 있다. SC층은 죽은 각질세포가 층층이 쌓여서 구성되며, 세라마이드, 콜레스테롤 그리고 지방산 등의 세포간지질 성분이 죽은 각질세포를 붙여주고 있어 피부 장벽의 형태를 유지하고 있다.
- [3] 이런 세포간지질 성분은 외부 물질의 피부침투를 방지하고, 피부의 표면에서 증발되는 수분의 양, 즉 경피수분손실량(Transepidermal Water Loss; TEWL)을 막아주는 기능을 가지고 있다. 또한 건강한 사람의 각질세포에는 천연보습인자(Natural Moisture Factor, NMF)가 고농도로 존재하기 때문에 피부 표면의 장력을 낮추고 케라틴으로부터 수분의 반발력을 받아 보습에 직접적인 영향을 주어 피부가 건조되는 것을 억제한다. 임상적으로 건성피부는 피부의 표면이 건조하여 탄력이 떨어지며, 각질 탈리(scaling)가 일어나기 쉽다. 피부탄력이 떨어지면 주름이 생기면서 피부에 생동감 등이 없어지기 때문에 피부 표면의 보습력을 유지하는 것이 피부탄력을 유지시켜주는 좋은 방법이다.
- [4] 한편, 피부의 진피층의 구성성분 중 피부 탄력과 주름에 영향을 주는 인자가 콜라겐과 엘라스틴이다. 콜라겐은 세포외기질(extracellular matrix; ECM)의 주요 구성성분으로써 두 개의 $\alpha 1(I)$ 사슬과 한 개의 $\alpha 2(I)$ 사슬로 이루어져 있으며 나이가 들어가면서 피부의 진피층에 있는 Type I 콜라겐에 의해 분해되는 것으로 알려져 있다. 이러한 콜라겐을 지탱해주는 단백질이 엘라스틴이다. 엘라스틴은 탄력성이 매우 크며 수축되거나 이완되어도 다시 본래의 형태로 돌아가는 성질이 있다. 이러한 엘라스틴 함유로 인해 피부 탄력이 유지된다. 하지만 외적노화와 내적노화의 원인이 되는 다양한 자극원으로부터 콜라겐 분해효소(Matrix Metallo-Proteinase; MMP)와 엘라스틴 분해효소가 생성되어

콜라겐과 엘라스틴이 분해되어 피부의 주름이 생성되고 탄력을 잃어 피부 노화가 일어나는 주요 원인이 된다.

- [5] 한편, 거미는 전세계에 약 3만종이 서식하는 절지동물로서, 우리나라에 약 60여종이 서식하는 것으로 알려져 있다. 서식장소로는 땅속, 땅위, 건물의 안팎 등 다양한 곳에서 서식하지만, 거미의 종류에 따라 거미집과 거미줄의 모양이 다른 것으로 알려져 있다. 거미가 거미줄을 만드는 과정으로는 거미 몸 안에서 액체상태의 단백질이 산과 만나 거미줄이 만들어지는데 거미줄이 한가닥 같아 보여도 뽑아내는 부분에서는 수많은 거미줄 가닥이 겹쳐지고 닿으면서 한가닥의 거미줄로 보이게 된다. 일반적으로 거미줄의 종류는 포획용, 안전용, 알보호용, 수컷이 암컷 거미에게 먹이선물을 줄 때 등으로 구분되어 진다. 거미줄은 탄성이 좋고 강철의 두께로 되었을 때 강철의 인장강도보다 약 5배가 튼튼한 것으로 알려져 있으며, 사람에게 알레르기를 일으키지 않으면서 친수성과 친유성을 갖는다.

- [6] 거미줄 단백질의 구성 펩타이드의 아미노산의 비율은 여러 논문 (International Journal of Biological Macromolecules 24(1999)265-270 등)에 의해 발표되었는데, GPGGX/GPGQQ, GGX 등이 공통된 아미노산 등이며 구성 비율로는 Gly 37.1%, Ala 21.1%, Arg 7.6%, Ser 4.5%, Glu 4.4%, Pro 4.3%, Leu 3.8%의 구성성분을 갖는 것으로 알려져 있다. 이중 Glu와 Gly는 친수성(hydrophilic)으로 물의 역할을 결정하는 역할을 한다. Gly, Glu, Tyr, Ser, Leu은 수축작용에 영향을 미쳐 분자적 운동을 증가시키는 것으로 보고되어 있다.

- [7] 한편, 거미줄은 붕대, 인공섬유, 방탄조끼 등의 방사기술로 이용되고 있을뿐, 거미줄을 화장품 조성물에 적용시키는 기술은 미미한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 10~70 KDa의 분자량을 가지는 거미줄 펩타이드 또는 거미줄을 붉은덕다리버섯(*Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*) 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물을 유효성분으로 함유하여 우수한 항산화 효과, 피부 주름개선 효과, 피부 보습 효과, 엘라스타아제 억제 효과 및 피부 탄력 증가효과를 발휘하는 화장품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [9] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 10~70 KDa의 분자량을 가지는 거미줄 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 화장품 조성물을 제공한다. 본 발명의 10~70 KDa의 분자량을 가지는 거미줄 펩타이드는 우수한 항산화 효과, MMP-1 생성 억제효과, 콜라겐합성 증진효과, 엘라스타아제 억제효과를 발휘한다. 또한, 상기 10~70 KDa의 분자량을 가지는 거미줄 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물은 우수한 피부 보습 효과, 피부 탄력 증진효과 및 피부 주름 개선효과를 발휘한다. 하기 실험예에 의하면

10 KDa 미만, 70 KDa 초과 분자량을 가지는 거미줄 펩타이드는 상기와 같은 우수한 피부 개선효과를 발휘하지 않음을 확인할 수 있다.

- [10] 본 발명에 있어서, 상기 거미줄 펩타이드는, 바람직하게 거미줄을 산 또는 프로테아제로 가수분해하여 수득된 것 좋다. 더욱 바람직하게는 가수분해된 거미줄 펩타이드를 분자량 컷 오프 레진을 이용하여 수득된 것을 사용하는 것이다.
- [11] 한편, 본 발명은 거미줄을 붉은덕다리버섯(*Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*) 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공한다. 본 발명의 거미줄 가수분해물은 우수한 항산화 효과, MMP-1 생성 억제효과, 콜라겐합성 증진효과, 엘라스타아제 억제효과를 발휘한다. 또한, 상기 거미줄 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물은 우수한 피부 보습 효과, 피부 탄력 증진효과 및 피부 주름 개선효과를 발휘한다. 하기 실험예에 의하면 상기 거미줄 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물이 일반 거미줄 추출물보다 월등히 우수한 피부 개선효과를 발휘함을 확인할 수 있었다.
- [12] 한편, 담자균류의 구멍장이버섯과에 속하는 붉은덕다리버섯(*Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*)은 우리나라의 백두산, 월출산, 지리산, 발왕산 등에 자생하며, 세계적으로는 일본, 아시아의 열대지방 전역에 걸쳐 분포한다. 봄부터 여름까지 침엽수의 생목, 고목, 그루터기 위에 중생하는 1년생 심재 갈색 부후성 버섯이다. 붉은덕다리 버섯은 예로부터 기능 조절, 건강 증진, 항질병에 효과가 있다고 전해내려 왔으나 정확한 약리효과에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다. 또한, 아직까지 거미줄을 붉은덕다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물의 우수한 피부 보습 효과, 피부 탄력 증진효과, 피부 주름 개선효과에 대해 개시된 바 없다.
- [13] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물은, 바람직하게 피부 주름 개선용, 피부 탄력 개선용, 피부 보습용일 수 있다.
- [14] 한편, 본 발명에 있어서, 상기 거미줄 펩타이드 또는 거미줄 가수분해물은, 바람직하게 화장료 조성물 전체 중량에 대하여 0.00001~30.0중량%가 함유되는 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 화장료 조성물 전체 중량에 대해서 0.01~10중량% 함유되는 것이 좋다. 상기 거미줄 펩타이드 또는 거미줄 가수분해물의 함량이 0.00001중량% 미만인 경우에는 피부 개선 효과가 나타나지 않고, 30.0중량%를 초과할 경우 함유량 증가에 따른 뚜렷한 효능이 증가하지 않는다.
- [15] 한편, 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 10~70 KDa 분자량을 가지는 거미줄 펩타이드 또는 거미줄 가수분해물 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [16] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한

제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 팩, 마사지크림 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

- [17] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [18] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [19] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [20] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로폴루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [21] 본 발명의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [22] 본 발명의 화장료 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 제형 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비 함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 젤이며, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [23] 본 발명에 의한 경우, 본 발명의 10~70 KDa의 분자량을 가지는 거미줄 펩타이드 또는 거미줄을 붉은덕다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물은 항산화 효과, MMP-1 생성 억제효과, 콜라겐합성 증진효과, 엘라스타아제 억제효과를 발휘하며, 상기 거미줄 펩타이드 또는 상기 거미줄 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물은 우수한 피부 보습 효과, 피부 탄력 증진효과 및 피부 주름 개선효과를 발휘한다.

발명의 실시를 위한 형태

- [24] 이하, 본 발명의 구성을 하기 실시예를 통해 구체적으로 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[25]

- [26] **[제조예 1: 산에 의해 가수분해된 거미줄 펩타이드 제조]**

- [27] 야생 및 실내에서 수거된 거미줄 10.0 g을 10배량의 1N의 HCl용액에 3시간동안 교반 후, 1N의 NaOH 용액으로 중화시켜 거미줄을 가수분해하였다. 이후, HP-20이 충전된 레진으로 1차 분획하여 거미줄 펩타이드 분획을 얻은 후, 세파덱스 레진(Sephadex LH-20)이 충전된 컬럼관으로 추가 정제하여 분자량 10~70 KDa의 거미줄 펩타이드를 수득하였다. 분자량은 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 그 후, 상기 수득한 거미줄 펩타이드를 1% 되게 50% 부틸렌글라이콜 수용액에 녹여 하기 실험예에서 사용하였다.

[28]

- [29] **[제조예 2: 프로테아제에 의해 가수분해된 거미줄 펩타이드 제조]**

- [30] 야생 및 실내에서 수거된 거미줄 10.0 g을 100 g의 물에 분산시킨 후, 프로테아제 (대중상사 Subtilisin) 10.0 g을 가한 다음 50°C에서 3일간 반응시켜 거미줄을 가수분해하였다. 이후, HP-20이 충전된 레진으로 1차 분획하여 거미줄 펩타이드 분획물을 얻은 후, 세파덱스 레진(Sephadex LH-20)이 충전된 컬럼관으로 추가 정제하여 분자량 10~70 KDa의 거미줄 펩타이드를 수득하였다. 분자량은 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다. 그 후, 상기 수득한 거미줄 펩타이드를 1% 되게 50% 부틸렌글라이콜 수용액에 녹여 하기 실험예에서 사용하였다.

[31]

- [32] **[제조예 3: 붉은덕다리버섯을 이용한 거미줄 가수분해물 제조]**

- [33] 야생 및 실내에서 수거된 거미줄 10.0 g을 100 g의 물에 분산시킨 후, 붉은덕다리버섯(*Laetiporus sulphureus*) C S 0218 (K F C C 11494 P) 균주 배양액을 첨가하였다. 여기에 탄소원으로 포도당 3%를 첨가하였으며, 펩톤 0.3%를 추가로 첨가하여 배양하였다. 배양은 5 L 발효조를 이용하여 7일간, 37°C, pH 6으로 유지하며 배양하였다. 배양 후 배양액을

원심분리하여 배양균을 1차 제거하였다.

- [34] 발효 후 배양균을 1차 제거한 거미줄 발효물을 최종 70%(V/V) 에탄올 수용액이 되도록 에탄올을 첨가하여 5시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 와트만(whatman) #10 여과지로 여과하였다. 이렇게 얻은 여과액을 다시 0.25 μM 의 여과기를 이용하여 최종 여과하여 거미줄 가수분해물을 수득하였다. 상기 거미줄 가수분해물을 1% 되게 50% 부틸렌글라이콜 수용액에 녹여 하기 실험예에서 사용하였다.

- [35] 하기 실험예에서는, 거미줄을 붉은덕다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물을 '붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물'이라고 지칭하였다.

[36]

- [37] **[비교제조예 1-1: 산에 의해 가수분해된 저분자 거미줄 펩타이드 제조]**

- [38] 상기 제조예 1에서 산에 의해 가수분해된 거미줄 펩타이드를 세파덱스 레진(Sephadex LH-20)이 충전된 컬럼관으로 분획하여 10 KDa 미만의 거미줄 펩타이드를 수득하였다. 그 후, 상기 저분자 거미줄 펩타이드를 1% 되게 50% 부틸렌글라이콜 수용액에 녹여 하기 실험예에서 사용하였다.

[39]

- [40] **[비교제조예 1-2: 산에 의해 가수분해된 고분자 거미줄 펩타이드 제조]**

- [41] 상기 제조예 1에서 산에 의해 가수분해된 거미줄 펩타이드를 세파덱스 레진(Sephadex LH-20)이 충전된 컬럼관으로 분획하여 70 KDa 초과인 거미줄 펩타이드를 수득하였다. 그 후, 상기 고분자 거미줄 펩타이드를 1% 되게 50% 부틸렌글라이콜 수용액에 녹여 하기 실험예에서 사용하였다.

[42]

- [43] **[비교제조예 2-1: 프로테아제에 의해 가수분해된 저분자 거미줄 펩타이드 제조]**

- [44] 상기 제조예 2에서 프로테아제에 의해 가수분해된 거미줄 펩타이드를 세파덱스 레진(Sephadex LH-20)이 충전된 컬럼관으로 분획하여 10 KDa 미만의 거미줄 펩타이드를 수득하였다. 그 후, 상기 저분자 거미줄 펩타이드를 1% 되게 50% 부틸렌글라이콜 수용액에 녹여 하기 실험예에서 사용하였다.

[45]

- [46] **[비교제조예 2-2: 프로테아제에 의해 가수분해된 고분자 거미줄 펩타이드 제조]**

- [47] 상기 제조예 2에서 프로테아제에 의해 가수분해된 거미줄 펩타이드를 세파덱스 레진(Sephadex LH-20)이 충전된 컬럼관으로 분획하여 70 KDa 초과인 거미줄 펩타이드를 수득하였다. 그 후, 상기 고분자 거미줄 펩타이드를 1% 되게 50% 부틸렌글라이콜 수용액에 녹여 하기 실험예에서 사용하였다.

[48]

- [49] **[비교제조예 3: 거미줄 추출물 제조]**

- [50] 야생 및 실내에서 수거된 거미줄 10.0 g을 1.0 kg 50% 부틸렌글라이콜 수용액에 녹인 후, 400메쉬 여과망으로 여과하여 거미줄 추출물을 제조하였다.
- [51]
- [52] **[실험예 1: 거미줄 추출물의 DPPH법을 이용한 항산화 효과 측정]**
- [53] 본 실험예에서는 상기 제조예 1 및 3에서 제조된 분자량 10~70 KDa의 거미줄 펩타이드와 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물의 피부 항산화 효과를 확인하고자 DPPH법을 이용하여 자유라디칼 소거율을 측정하였다.
- [54] DPPH법은 DPPH(2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) 자유라디칼이라는 유리기를 사용하여 환원력에 의한 항산화 효과를 측정하는 방법이다. 시료에 의해 DPPH가 환원되어 흡광도가 감소하는 정도를 공시험액의 흡광도와 비교하여 파장 560 nm에서 자유라디칼 소거율(%)을 측정할 수 있다. 사용한 시약으로는 2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl 자유라디칼 (Aldrich Chem. Co., MW=618.76) 0.1 mM 용액 61.88 mg을 메탄올에 용해하여 100 ml로 한 후, 사용하였으며, 측정방법은 하기와 같았다. 사용한 시료로는 상기 제조예 1 내지 3 및 비교제조예 1-1 내지 3에서 제조된 거미줄 펩타이드, 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물 및 거미줄 추출물이며, 양성 대조군으로 비타민 C를 사용하였다.
- [55] <측정방법>
- [56] ① 96-웰 플레이트에 0.1 mM DPPH 용액 0.15 ml와 시료 용액 0.15 ml를 가하여 빨리 교반하고 25°C에서 10분간 배양을 개시한다.
- [57] ② 그 후 560 nm에서의 흡광도 St를 측정한다.
- [58] ③ 시료 용액의 블랭크 (Blank)는 상기 0.1 mM DPPH 용액 대신 메탄올을 사용하는 것을 제외하고는 상기 흡광도 St를 측정하는 때와 동일하게 조작하여 흡광도 So를 측정한다.
- [59] ④ 공시험은 상기 시료 용액 대신 증류수를 사용하는 것을 제외하고는 상기 흡광도 St를 측정하는 때와 동일하게 조작하여 흡광도 Bt를 측정한다.
- [60] ⑤ 공시험의 블랭크(Blank)는 상기 0.1 mM DPPH 용액 대신 메탄올을 사용하고 상기 시료 용액 대신 증류수를 사용하는 것을 제외하고는 상기 흡광도 St를 측정하는 때와 동일하게 조작하여 흡광도 Bo를 측정한다.
- [61] 자유라디칼 소거율(%)의 결과는 하기 수식 1에 의하여 산출하였으며, 그 결과는 하기의 표 1과 같았다.
- [62] [수식1]

$$\text{자유라디칼 소거율(\%)} = \left[1 - \frac{(St - So)}{(Bt - Bo)} \right] \times 100$$

- [63] St: 시료의 자유라디칼 소거 후의 560 nm에서의 흡광도
- [64] Bt: 공시험용액의 자유라디칼 소거 후의 560 nm에서의 흡광도
- [65] So: 시료의 자유라디칼 무첨가시 반응 전의 560 nm에서의 흡광도

[66] Bo : 공시험용액의 자유라디칼 무침가시 반응 전의 560 nm에서의 흡광도

[67] [표1]

시료 명	처리 농도(ppm)	자유라디칼 소거율 (%)								
		제조 예 1	제조 예 2	제조 예 3	비교 제조 예 1-1	비교 제조 예 1-2	비교 제조 예 2-1	비교 제조 예 2-2	비교 제조 예 3	비타 민 C(300 ppm)
거미 줄 추출 물	300	94.82	93.21	96.22	4.24	4.11	3.07	2.27	5.21	91.44
	150	85.25	88.72	90.43	3.96	4.32	2.87	2.52	5.66	85.33
	75	72.30	75.66	81.55	3.72	3.85	3.15	3.43	4.88	51.23
	37.5	64.39	71.11	74.65	4.04	3.92	3.19	2.99	3.37	35.45
	18.75	56.38	50.26	62.21	4.52	4.04	4.01	3.31	2.86	31.23

[68]

[69] 실험결과, 10~70 KDa 거미줄 펩타이드 (제조예 1 및 2) 및 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물 (제조예 3)은 농도 의존적으로 항산화 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 300 ppm 농도에서는 양성대조군인 비타민 C보다 우수한 항산화 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다. 또한, 10 KDa 미만 및 70 KDa 초과인 거미줄 펩타이드 (비교제조예 1-1 내지 2-2) 및 거미줄 추출물 (비교제조예 3)은 항산화 효과가 없는 것을 확인할 수 있었다.

[70] 상기와 같은 결과로부터, 분자량이 10~70 KDa인 거미줄 펩타이드와 거미줄을 붉은덕다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물은 우수한 항산화 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다.

[71]

[72] [실험예 2: 거미줄 추출물의 콜라겐 분해효소(MMP-1) 생성 억제 효과 측정]

[73] 본 실험예에서는 상기 제조예 1 내지 3에서 제조된 분자량 10~70 KDa의 거미줄 펩타이드 및 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물의 콜라겐 분해효소(MMP-1) 생성 억제 효과를 확인하고자 하였다.

[74] 인간 정상 피부 세포인 섬유아세포 (한국 세포주 은행, 대한민국)를 48-웰 마이크로 플레이트 (Nunc, 덴마크)에 각 웰당 1×10^6 세포가 되도록 접종하고, DMEM 배지 (Sigma, 미합중국) 및 37°C의 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 상기 제조예 1 내지 3과 비교제조예 1-1 내지 3의 거미줄 펩타이드, 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물, 거미줄 추출물 및 양성대조군으로 TGF- β 를 첨가한 후, 48시간 동안 추가로 배양하였다. 이때, 시료가 미첨가된 배지를 대조군으로 하였다.

[75] 배양 후, 각 웰의 상층액을 모아 MMP-1 분석 키트 (Amersham, 미합중국)를

이용하여 새로 합성된 MMP-1의 양(ng/ml)을 측정한 후, 하기 수식 2에 따라 MMP-1 생성 억제율(%)을 계산하였으며, 그 결과는 하기 표 2와 같았다.

[76] [수식2]

$$\text{MMP-1 생성억제율(\%)} = \left[1 - \frac{\text{실험군의 MMP-1의 양}}{\text{대조군의 MMP-1의 양}} \right] \times 100$$

[77] [표2]

시료 명	처리 농도(ppm)	MMP-1 생성억제율 (%)							
		제조예 1	제조예 2	제조예 3	비교제 조예 1-1	비교제 조예 1-2	비교제 조예 2-1	비교제 조예 2-2	비교제 조예 3
거미 줄 추출 물	300	97.25	93.74	98.41	5.42	3.34	4.22	2.97	3.43
	150	85.33	89.36	90.25	3.81	4.82	4.65	3.48	8.33
	75	75.23	78.66	81.43	3.55	3.67	5.14	4.02	8.98
	37.5	64.65	60.33	70.51	4.42	5.25	3.82	3.37	5.17
	18.75	55.17	55.63	62.43	5.15	5.01	3.71	5.13	4.55
TGF-β	200n M	75.3							

[78]

[79] 실험결과, 10~70 KDa 거미줄 펩타이드 (제조예 1 및 2) 및 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물 (제조예 3)은 농도 의존적으로 MMP-1의 생성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 10~70 KDa 거미줄 펩타이드 및 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물을 75 ppm 처리 시, 양성대조군인 TGF-β(200nM)와 동등한 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다. 또한, 10 KDa 미만 및 70 KDa 초과인 거미줄 펩타이드 (비교제조예 1-1 내지 2-2) 및 거미줄 추출물 (비교제조예 3)은 MMP-1 억제 효과가 없는 것을 확인할 수 있었다.

[80] 상기와 같은 결과로부터, 분자량이 10~70 KDa인 거미줄 펩타이드 또는 거미줄을 붉은덕다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물은 우수한 콜라겐분해효소 활성 억제 효능을 발휘함을 확인할 수 있었다.

[81]

[82] [실험예 3: 거미줄 추출물의 콜라겐 합성 증진 효과 확인]

[83] 본 실험예에서는 상기 제조예 1 내지 3에서 제조된 분자량 10~70 KDa의 거미줄 펩타이드 및 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물의 콜라겐 합성 증진 효과를

확인하고자 하였다.

[84] 인간 정상 상피 세포인 섬유아세포를 48-웰 마이크로 플레이트에 각 웰당 1×10^6 세포가 되도록 접종하고, DMEM 배지에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 상기 제조예 1 내지 3과 비교제조예 1-1 내지 3의 거미줄 펩타이드, 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물, 거미줄 추출물 및 양성대조군으로 TGF- β 를 첨가한 후, 48시간 동안 추가 배양하였다. 이때, 시료가 미첨가된 배지를 대조군으로 하였다.

[85] 배양 후, 각 웰의 상층액을 모아 콜라겐 키트(Takara, 일본)를 이용하여 프로콜라겐(procollagen) 타입 I C-펩타이드 (PICP) 양을 측정하여 ng/ml로 환산하였으며, 이에 의해 합성된 콜라겐 양을 측정하였다. 콜라겐 생합성 증가율(%)은 하기 수식식 3에 따라 계산하였으며, 그 결과는 하기 표 3과 같았다.

[86] [수식3]

$$\text{콜라겐 생합성 증가율(\%)} = \left[\frac{\text{실험군의 콜라겐양}}{\text{대조군의 콜라겐양}} - 1 \right] \times 100$$

[87] [표3]

시료 명	처리 농도(ppm)	콜라겐 생합성 증가율 (%)							
		제조예 1	제조예 2	제조예 3	비교제 조예 1-1	비교제 조예 1-2	비교제 조예 2-1	비교제 조예 2-2	비교제 조예 3
거미 줄 추출 물	300	173.65	180.35	185.31	102.95	102.75	95.44	101.19	102.35
	150	164.12	168.50	170.43	101.82	102.92	93.32	102.54	98.50
	75	151.91	155.87	159.17	103.02	103.35	102.71	93.78	93.87
	37.5	143.31	131.12	138.33	102.75	102.88	101.85	94.65	102.12
	18.75	123.11	111.24	128.45	102.52	103.15	101.32	93.65	101.24
TGF- β	200nM	175.23							

[88]

[89] 실험결과, 10~70 KDa 거미줄 펩타이드 (제조예 1 및 2) 및 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물 (제조예 3)은 농도 의존적으로 콜라겐 생합성율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 10~70 KDa 거미줄 펩타이드 및 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물은 300 ppm으로 처리 시, 양성대조군인 TGF- β (200nM) 보다 우수한 콜라겐 생합성 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다. 또한, 10 KDa 미만 및 70 KDa 초과인 거미줄 펩타이드 (비교제조예 1-1 내지 2-2)

및 거미줄 추출물 (비교제조예 3)은 콜라겐 생합성 효과가 없는 것을 확인 할 수 있었다.

- [90] 상기와 같은 결과로부터, 분자량이 10~70 KDa인 거미줄 펩타이드 또는 거미줄을 붉은덕다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물은 우수한 콜라겐 생합성 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다.

[91]

[92] **[실험예 4: 거미줄 추출물의 엘라스테이즈 억제 효과 확인]**

- [93] 본 실험예에서는 상기 제조예 1 내지 3에서 제조된 분자량 10~70 KDa의 거미줄 펩타이드 및 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물의 엘라스테이즈 억제 효과를 확인하고자 하였다.

- [94] 먼저 상기 제조예 1 내지 3과 비교제조예 1-1 내지 3에서 수득한 거미줄 펩타이드, 거미줄 가수분해물 및 거미줄 추출물을 하기 표 4에 기재된 농도로 준비하였다. 각 시료를 96웰 플레이트에 100 μ l를 넣고 트리스 버퍼(Tris buffer, Sigma T1503) 60 μ l를 넣었다. 여기에 기질 (N-Suc-Ala-Ala-Ala-NA-8.8mM)을 각각 20 μ l씩 넣고, 효소 (엘라스테이즈, Sigma E0258, 10 μ g/ml)를 20 μ l 넣은 후, 25°C에서 15분간 반응시킨 다음, 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조군은 시료 대신 완충액을 넣은 것으로 하였다. 엘라스테이즈 억제율(%)은 하기 수식식 4에 따라 계산하였으며, 그 결과는 하기 표 4와 같았다.

- [95] [수식4]

$$\text{엘라스테이즈 억제율(\%)} = \left[1 - \frac{\text{실험군의 엘라스테이즈의 양}}{\text{대조군의 엘라스테이즈의 양}} \right] \times 100$$

- [96] [표4]

시료 명	처리 농도(ppm)	엘라스테이즈 억제율 (%)							
		제조예 1	제조예 2	제조예 3	비교제 조예 1-1	비교제 조예 1-2	비교제 조예 2-1	비교제 조예2- 2	비교제 조예 3
거미 줄 추출 물	300	93.65	90.24	95.21	3.47	1.36	3.54	1.95	3.54
	150	84.1	79.47	85.43	2.65	1.92	3.74	2.98	1.24
	75	51.9	45.57	60.09	2.28	2.85	2.96	3.81	5.11
	37.5	43.3	31.45	51.25	1.51	3.64	4.42	4.72	3.54
	18.75	23.13	11.28	33.36	3.35	2.21	1.55	2.64	-

[97]

- [98] 실험결과, 10~70 KDa 거미줄 펩타이드 (제조예 1 및 2)와 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물 (제조예 3)은 농도 의존적으로 엘라스테이즈 억제율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 10 KDa 미만 및

70 KDa 초과인 거미줄 펩타이드 (비교제조예 1-1 내지 2-2) 및 거미줄 추출물 (비교제조예 3)은 엘라스테이즈 억제 효과가 없는 것을 확인 할 수 있었다.

[99] 상기와 같은 결과로부터, 분자량이 10~70 KDa인 거미줄 펩타이드 및 거미줄을 붉은덕다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물은 우수한 엘라스테이즈 억제 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다.

[100]

[101] [실시예 1: 거미줄 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 제조]

[102] 본 실시예에서는 하기 표 5와 같이 성분을 A-B-C의 순서대로 혼합하여 거미줄 펩타이드, 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물 또는 거미줄 추출물을 함유하는 화장료 조성물을 제조한 후, 각각 제형예 1 내지 3, 비교제형예 1 내지 5라고 지칭하였다.

[103] [표5]

구 분	성분	제 형 예 1	제 형 예 2	제 형 예 3	비 교 제 형 예 1	비 교 제 형 예 2	비 교 제 형 예 3	비 교 제 형 예 4	비 교 제 형 예 5
A	10~70 KDa 거미줄 웹타이드(제 조예 1)	5.0	-	-	-	-	-	-	-
	10~70 KDa 거미줄 웹타이드(제 조예 2)	-	5.0	-	-	-	-	-	-
	붉은덕다리 버섯-거미줄 가수분해물(제조예 3)	-	-	5.0	-	-	-	-	-
	10 KDa 미만 거미줄 웹타이드(비 교제조예 1-1)	-	-	-	5.0	-	-	-	-
	70 KDa 초과 거미줄 웹타이드(비 교제조예 1-2)	-	-	-	-	5.0	-	-	-
	10 KDa 미만 거미줄 웹타이드(비 교제조예 2-1)	-	-	-	-	-	5.0	-	-
	70 KDa 초과 거미줄 웹타이드(비 교제조예 2-2)	-	-	-	-	-	-	5.0	-

B	거미줄 추출물(비교 제조예 3)	-	-	-	-	-	-	-	5.0
	EDTA-2Na	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
	정제수	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100
	세토스테아 릴알코올	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
	글리세릴스 테아레이트	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
	마이크로크 리스탈린	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
	스쿠알	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	유동과라핀	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	트리옥타노 인	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	폴리솔베이 트	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
	솔비탄스테 아레이트	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	토코페릴아 세테이트	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	사이클로메 치콘	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
	BHT	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
C	향,방부제	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량	적량

[104]

[105] [실험예 5: 거미줄 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 피부 보습 효과 확인]

[106] 본 실험예에서는 상기 실시예 1에서 제조된 제형예 1 내지 3과 비교제형예 1 내지 5의 화장료 조성물의 피부 보습 효과를 확인하고자 하였다.

[107] 설문 조사를 통하여 피부가 건조하다고 느끼는 건강한 성인 남녀 200명을 무작위로 25명씩 8개 그룹 (A, B, C, D, E, F, G 및 H)으로 나눈 후, A, B, C 그룹에는 제형예 1 내지 3의 화장료 조성물을 D, E, F, G, H 그룹에는 비교제형예 1 내지 5의 화장료 조성물을 각각 1일 2회씩 8주간 안면에 도포하게 하였다. 보습 효과는 사용전, 사용 2, 4주 후에 수분측정기 (Corneometer CM 820, Corage

+Khazaka, Germany)를 이용하여 평가하였다. 실험 결과는 하기 표 6에 나타내었다.

[108] [표6]

구분	사용 전	사용 2주 후	사용 4주 후
제형 예 1	23.5	38.6	45.7
제형 예 2	23.2	37.4	44.6
제형 예 3	23.3	39.4	46.2
비교제형 예 1	23.1	25.5	27.1
비교제형 예 2	23.0	26.8	28.0
비교제형 예 3	23.2	24.3	25.8
비교제형 예 4	22.9	26.2	26.7
비교제형 예 5	22.8	26.5	26.9

[109] (단위: g/h/cm²)

[110] 실험결과, 제형 예 1 내지 3의 화장료 (10~70 KDa 거미줄 펩타이드 또는 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물 함유 화장료 조성물)가 비교제형 예 1 내지 5 (10 KDa 미만, 70 KDa 초과 거미줄 펩타이드 또는 거미줄 추출물 함유 화장료 조성물)보다 우수한 피부 보습 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다.

[111] 상기와 같은 결과로부터, 분자량이 10~70 KDa인 거미줄 펩타이드 및 거미줄을 붉은덕다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물을 함유하는 화장료 조성물은 우수한 피부 보습 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다.

[112]

[113] [실험 예 6: 거미줄 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 피부 탄력 효과 확인]

[114] 본 실험예에서는 상기 실시예 1에서 제조된 제형 예 1 내지 3과 비교제형 예 1 내지 5의 화장료 조성물의 피부 탄력 효과를 확인하고자 하였다.

[115] 30~50대 여성 20명을 대상으로 제형 예 1 내지 3과 비교제형 예 1 내지 5를 아침, 저녁 1일 2회 사용하도록 하였다. 그 후, 사용 전, 사용 2, 4주 경과 후 큐토미터(Cutometer) SEM 575를 이용하여 눈가 부위의 피부탄력을 측정하였다. 기기측정시 미온수로 세안 후 항온항습실에서 20분 경과 후 측정하였다. 결과는 하기 표 7과 같았다.

[116] [표7]

구분	사용 전	사용 2주 후	사용 4주 후
제형 예 1	0.64	0.72	0.80
제형 예 2	0.66	0.75	0.82
제형 예 3	0.64	0.76	0.85
비교제형 예 1	0.65	0.68	0.71
비교제형 예 2	0.66	0.67	0.70
비교제형 예 3	0.63	0.65	0.67
비교제형 예 4	0.64	0.66	0.69
비교제형 예 5	0.65	0.67	0.70

[117] (단위: Elasticity (R2))

[118]

[119] 실험결과, 제형 예 1 내지 3 (10~70 KDa 거미줄 펩타이드 또는 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물 함유 화장료 조성물)은 비교제형 예 1 내지 5 (10 KDa 미만, 70 KDa 초과)의 거미줄 펩타이드 또는 거미줄 추출물 함유 화장료 조성물)보다 우수한 피부 탄력 증진 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다.

[120] 상기와 같은 결과로부터, 분자량이 10~70 KDa인 거미줄 펩타이드 및 거미줄을 붉은덕다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물을 함유하는 화장료 조성물은 우수한 피부 탄력 증진 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다.

[121]

[122] [실험 예 7: 거미줄 추출물을 함유하는 화장료 조성물의 피부 주름 개선효과 확인]

[123] 본 실험예에서는 상기 실시예 1에서 제조된 제형 예 1 내지 3과 비교제형 예 1 및 2의 화장료 조성물의 피부 주름 개선효과를 확인하고자 하였다.

[124] 20~35세 100명의 여성을 대상으로 각각 20명씩 제형 예 1 내지 3과 비교제형 예 1 및 2의 화장료 조성물을 얼굴 양쪽면에 6주 동안 사용하도록 하였다. 사용 6주 후, 주름 개선 효과를 육안으로 평가하여 주름 개선 정도를 확인하였다.

[125] 피부 주름 개선 효과는 제품 사용 전과 3개월간 사용 후의 각 피검자의 주름 개선 효과를 숙련된 의사의 육안 관찰을 통하여 평가하였으며, 이 평가를 토대로한 주름 개선 효과 결과는 하기의 표 8에 나타내었다.

[126] 또한, 하기 수식식 5를 이용하여 유효율(%)을 계산하였다.

[127] [수식5]

$$\text{유효율}(\%) = \frac{\text{평가인원(우수)} + \text{평가인원(약간)}}{2} \div \text{전체실험참가인원} \times 100$$

[128] [표8]

	주름 개선 효과			유효율(%)
	우수	약간	없음	
제형예 1	16	2	2	85
제형예 2	14	4	2	80
제형예 3	17	2	1	90
비교제형예 1	2	11	7	37.5
비교제형예 2	1	10	9	30

[129] (단위 : 명)

[130]

[131] 실험결과, 제형예 1 내지 3 (10~70 KDa 거미줄 펩타이드 또는 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물 함유 화장료 조성물)은 비교제형예 1 및 2 (10 KDa 미만 또는 70 KDa 초과 거미줄 펩타이드 함유 화장료 조성물) 보다 약 2배 높은 피부 주름개선 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다.

[132] 또한, 본 발명의 10~70 KDa 거미줄 펩타이드 또는 붉은덕다리버섯-거미줄 가수분해물을 함유하는 화장료 조성물을 피부에 도포한 대부분의 피검자들에게서 피부 자극을 관찰할 수 없었다.

[133] 상기와 같은 결과로부터, 분자량이 10~70 KDa인 거미줄 펩타이드 및 거미줄을 붉은덕다리버섯 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물을 함유하는 화장료 조성물은 우수한 피부 주름 개선 효과를 발휘함을 확인할 수 있었다.

청구범위

- [청구항 1] 거미줄의 가수분해물로서 10~70 KDa의 분자량을 가지는 거미줄 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 거미줄 펩타이드는,
거미줄을 산 또는 프로테아제로 가수분해하여 수득된 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 화장료 조성물은,
피부 주름 개선용인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 화장료 조성물은,
피부 탄력 개선용인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 화장료 조성물은,
피부 보습용인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 6] 거미줄을 붉은덕다리버섯(*Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*) 발효에 의해 가수분해하여 수득한 거미줄 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 화장료 조성물은,
피부 주름 개선용인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서,
상기 화장료 조성물은,
피부 탄력 개선용인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서,
상기 화장료 조성물은,
피부 보습용인 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/007698**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 8/64(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 8/64; A61K 8/65; A61K 8/98; A61K 8/899; A61Q 19/00; A61K 8/25; A61K 8/97; A61K 7/48; A61K 7/00; A61Q 19/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: spider web, hydrolysate, cosmetic composition, *Laetiporus sulphureus* var. *miniatus*, fermentation**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1508614 B1 (HANSOLBIO et al.) 08 April 2015 See abstract; claims 1-2; paragraph [0036].	1-9
A	CN 103126918 A (CHONGZHOU DILONG HAILONG BIOLOGICAL PRODUCTS DEVELOPMENT CO., LTD.) 05 June 2013 See abstract; claims 1 and 3.	1-9
A	JP 11-269061 A (LOREAL SA.) 05 October 1999 See abstract; claims 1 and 4.	1-9
A	KR 10-2014-0119094 A (MOMENTIVE PERFORMANCE MATERIALS INC.) 08 October 2014 See abstract; claim 1.	1-9
A	KR 10-2015-0007368 A (HANBUL COSMETICS CO., LTD.) 21 January 2015 See abstract; claims 1 and 3-4.	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 OCTOBER 2016 (21.10.2016)

Date of mailing of the international search report

21 OCTOBER 2016 (21.10.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/007698

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1508614 B1	08/04/2015	NONE	
CN 103126918 A	05/06/2013	NONE	
JP 11-269061 A	05/10/1999	AT 254448 T	15/12/2003
		CA 2259550 A1	11/08/1999
		CA 2259550 C	23/05/2006
		DE 69912870 T2	02/09/2004
		EP 0943323 A1	22/09/1999
		EP 0943323 B1	19/11/2003
		ES 2212481 T3	16/07/2004
		FR 2774588 A1	13/08/1999
		FR 2774588 B1	05/05/2000
		US 2002-0064539 A1	30/05/2002
		US 2005-0019297 A1	27/01/2005
		US 6280747 B1	28/08/2001
		US 6841162 B2	11/01/2005
		US 7148039 B2	12/12/2006
KR 10-2014-0119094 A	08/10/2014	CN 104136002 A	05/11/2014
		CN 104159640 A	19/11/2014
		EP 2800551 A2	12/11/2014
		EP 2800608 A2	12/11/2014
		JP 2015-503584 A	02/02/2015
		JP 2015-503587 A	02/02/2015
		KR 10-2014-0119091 A	08/10/2014
		US 2013-0171080 A1	04/07/2013
		WO 2013-103701 A2	11/07/2013
		WO 2013-103701 A3	26/06/2014
		WO 2013-103832 A2	11/07/2013
		WO 2013-103832 A3	10/07/2014
KR 10-2015-0007368 A	21/01/2015	KR 10-1550309 B1	07/09/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 8/64(2006.01)i, A61K 8/97(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i, A61Q 19/08(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 8/64; A61K 8/65; A61K 8/98; A61K 8/899; A61Q 19/00; A61K 8/25; A61K 8/97; A61K 7/48; A61K 7/00; A61Q 19/08 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 거미줄, 가수분해물, 화장료 조성물, 붉은덕다리버섯, 발효																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-1508614 B1 (한솔바이오 주식회사 등) 2015.04.08 요약; 청구항 1-2; 단락 [0036] 참조.</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103126918 A (CHONGZHOU DILONG HAILONG BIOLOGICAL PRODUCTS DEVELOPMENT CO., LTD.) 2013.06.05 요약; 청구항 1 및 3 참조.</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 11-269061 A (L'OREAL SA) 1999.10.05 요약; 청구항 1 및 4 참조.</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2014-0119094 A (모멘티브 퍼포먼스 머티리얼즈 인크.) 2014.10.08 요약; 청구항 1 참조.</td> <td>1-9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2015-0007368 A (한불화장품주식회사) 2015.01.21 요약; 청구항 1 및 3-4 참조.</td> <td>1-9</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	KR 10-1508614 B1 (한솔바이오 주식회사 등) 2015.04.08 요약; 청구항 1-2; 단락 [0036] 참조.	1-9	A	CN 103126918 A (CHONGZHOU DILONG HAILONG BIOLOGICAL PRODUCTS DEVELOPMENT CO., LTD.) 2013.06.05 요약; 청구항 1 및 3 참조.	1-9	A	JP 11-269061 A (L'OREAL SA) 1999.10.05 요약; 청구항 1 및 4 참조.	1-9	A	KR 10-2014-0119094 A (모멘티브 퍼포먼스 머티리얼즈 인크.) 2014.10.08 요약; 청구항 1 참조.	1-9	A	KR 10-2015-0007368 A (한불화장품주식회사) 2015.01.21 요약; 청구항 1 및 3-4 참조.	1-9
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
A	KR 10-1508614 B1 (한솔바이오 주식회사 등) 2015.04.08 요약; 청구항 1-2; 단락 [0036] 참조.	1-9																		
A	CN 103126918 A (CHONGZHOU DILONG HAILONG BIOLOGICAL PRODUCTS DEVELOPMENT CO., LTD.) 2013.06.05 요약; 청구항 1 및 3 참조.	1-9																		
A	JP 11-269061 A (L'OREAL SA) 1999.10.05 요약; 청구항 1 및 4 참조.	1-9																		
A	KR 10-2014-0119094 A (모멘티브 퍼포먼스 머티리얼즈 인크.) 2014.10.08 요약; 청구항 1 참조.	1-9																		
A	KR 10-2015-0007368 A (한불화장품주식회사) 2015.01.21 요약; 청구항 1 및 3-4 참조.	1-9																		
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2016년 10월 21일 (21.10.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 10월 21일 (21.10.2016)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 조기훈 전화번호 +82-42-481-5655 																		

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1508614 B1	2015/04/08	없음	
CN 103126918 A	2013/06/05	없음	
JP 11-269061 A	1999/10/05	AT 254448 T CA 2259550 A1 CA 2259550 C DE 69912870 T2 EP 0943323 A1 EP 0943323 B1 ES 2212481 T3 FR 2774588 A1 FR 2774588 B1 US 2002-0064539 A1 US 2005-0019297 A1 US 6280747 B1 US 6841162 B2 US 7148039 B2	2003/12/15 1999/08/11 2006/05/23 2004/09/02 1999/09/22 2003/11/19 2004/07/16 1999/08/13 2000/05/05 2002/05/30 2005/01/27 2001/08/28 2005/01/11 2006/12/12
KR 10-2014-0119094 A	2014/10/08	CN 104136002 A CN 104159640 A EP 2800551 A2 EP 2800608 A2 JP 2015-503584 A JP 2015-503587 A KR 10-2014-0119091 A US 2013-0171080 A1 WO 2013-103701 A2 WO 2013-103701 A3 WO 2013-103832 A2 WO 2013-103832 A3	2014/11/05 2014/11/19 2014/11/12 2014/11/12 2015/02/02 2015/02/02 2014/10/08 2013/07/04 2013/07/11 2014/06/26 2013/07/11 2014/07/10
KR 10-2015-0007368 A	2015/01/21	KR 10-1550309 B1	2015/09/07